

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique

FACULTÉ DES SCIENCES

Prof. E. CHERBULIEZ

Recherches sur le principe purgatif de l'huile de croton

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences chimiques

par

Marianne BÉGUIN

Pharmacienne diplômée, licenciée ès sciences chimiques et biologiques

de

Rochefort (Neuchâtel)

Thèse N° 1275

Editions Médecine et Hygiène

GENÈVE

1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552305_0058

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique

FACULTÉ DES SCIENCES

Prof. E. CHERBULIEZ

Recherches sur le principe purgatif de l'huile de croton

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences chimiques

par

Marianne BÉGUIN

Pharmacienne diplômée, licenciée ès sciences chimiques et biologiques

de

Rochefort (Neuchâtel)

Thèse N° 1275



Editions Médecine et Hygiène
GENÈVE

1958

La faculté des sciences, sur le préavis de Monsieur le professeur E. Cherbuliez, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 18 décembre 1957.

*Le doyen :
Fernand Chodat*

Thèse N° 1275

Que Monsieur le Professeur E. Cherbuliez trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il n'a cessé de prendre à ce travail, pour l'encouragement et les précieux conseils qu'il a bien voulu me donner.

A MES PARENTS

A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

INTRODUCTION

De nombreux travaux ont été consacrés à l'huile de croton. Citons en particulier ceux de E. Ehninger, E. Cherbuliez et collaborateurs. Ces auteurs ont montré la dualité des principes vésicant et purgatif. (1) (2) (3).

Dans l'étude du purgatif, la grande difficulté est l'absence d'un test spécifique. En effet, ni la fluorescence en lumière ultraviolette, ni la réaction de Liebermann étudiée par Boymond (4) et Sorgès (5), ni la réduction du permanganate de potassium que nous avons mise en évidence (6), ne sont caractéristiques du seul purgatif. De nombreuses réactions colorées ont été essayées en vain (7). D'autre part, nous avons vérifié expérimentalement que ni le rat, ni le cobaye se sont sensibles à ce principe purgatif. Il faut avoir recours à l'essai sur l'homme. Par conséquent, nous n'avons pu utiliser que nos réactions personnelles pour suivre le principe actif au long de nos essais d'enrichissement et de purification. Comme tout test biologique, de telles réactions sont sujettes à variations, que ce soit d'un individu à l'autre, ou, pour un même individu, d'une ingestion à l'autre.

Pour le vésicant, le problème est le même: le seul test est la dégustation. Ainsi donc, les huiles fractionnées peuvent en contenir encore, sans que cela soit perceptible.

-
- 1) E. Ehninger, Thèse, Genève 1932, p. 25
 - 2) P. Boymond, Thèse, Genève 1940, chap. 3
 - 3) E. Cherbuliez, P. Boymond et A. Ineichen, Bulletin Galenica
16: 37 (1953)
 - 4) Loc. cit. p. 20
 - 5) F. Sorgès, Chimica e Industria 22: 267 (1940)
 - 6) Cf p. 21 et 25
 - 7) Cf p. 24

En outre, il ne faut pas oublier qu'on ne saurait affirmer, à l'heure actuelle, que le purgatif est un principe unique et non multiple.

Produit de départ: Oleum Crotonis Ph.H.V.

C'est une huile pressée à froid, dont les caractéristiques, déterminées au moyen des méthodes de la Pharmacopée Helvétique, sauf l'indice de saponification, sont les suivantes:

Indice d'iode	97
Indice d'acidité	13
Indice de saponification (8)	199
Indice d'ester	186
Insaponifiable	0,9%

La dose purgative minimum est de 25 à 30 mgr.

Cette huile donne une coloration rouge avec le réactif de Liebermann (9). L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité d'huile présente, si cette quantité est comprise entre 10 et 50 mgr, dissous dans 10 ml de chloroforme et additionnés d'un mélange de 6,5 ml d'anhydride acétique et de 0,5 ml d'acide sulfurique concentré (photocolorimètre Klett, filtre vert).

- 8) déterminé par la méthode de saponification fractionnée, en raison de la forte coloration qui rend très délicat le titrage direct avec des indicateurs colorés, G.Chams, Thèse, Genève 1952, p. 10.
- 9) cf. p. 5, réf. 4) et 5).

Première partie

Préparation d'une huile purgative concentrée

Dans l'étude du principe purgatif de l'huile de croton, le premier problème à résoudre est de le débarrasser du vésicant, indésirable au point de vue pharmacodynamique, et des lipides qui lui servent de véhicule, aussi complètement que possible. Pour le premier stade de l'enrichissement, nous avons envisagé 3 méthodes, qui permettent de préparer des huiles concentrées 3 à 7 fois par rapport au produit de départ.

Ce sont

- 1) la saponification enzymatique
- 2) la filtration sur alumine
- 3) la concentration au méthanol.

Ensuite, par partage entre 2 solvants non miscibles, les huiles obtenues ainsi peuvent être enrichies à leur tour environ 10 fois.

Chapitre premier

Essais de délipidation par saponification

A. Saponification à la potasse alcoolique

Méthode brutale qui hydrolyse toutes les formes d'esters, les anhydrides, etc., sans toucher aux hétérosides ni aux éthers. Le procédé employé est celui de la Ph.H.V. pour déterminer l'insaponifiable des graisses. Il conduit à la destruction du principe purgatif (10).

B. Saponification à l'éthylate de Na en milieu anhydre

Cette méthode est un peu moins brutale que la précédente, car on travaille à la température ordinaire, et en l'absence de NaOH.

Procédé: On sèche un appareil à distiller à l'alcool absolu, puis une nuit à l'étuve à 110°. On le monte encore chaud. Dans le ballon à distiller, on met 50 ml d'alcool absolu et un peu de sodium. Lorsque tout ce dernier a réagi, on distille et recueille 20 à 30 ml d'alcool parfaitement anhydre. On ajoute peu à peu à cet alcool 2 à 3 g de sodium rapidement décapé. Quand la réaction est terminée, on introduit dans le ballon un godet contenant 1 à 2 g d'huile de croton. On agite pour bien mélanger, et laisse reposer 15 à 20 h. à l'obscurité et à la température ordinaire. Ensuite on extrait l'huile comme après saponification ordinaire, mais en travaillant à une température $\leq 4^\circ$. On limite ainsi l'action possible de la soude caustique formée. L'éther est lavé et séché sur SO_4Na_2 anhydre, puis distillé à pression réduite.

10) P. Boymond, Thèse 1940, p. 34

Essais :

a/ huile = 1,6380 g
résidu d'évaporation de l'éther = 0,1760 = 11 %

Si le purgatif n'a pas été détruit, la dose purgative minimum théorique sera égale à 3 mg. En fait 18 mg = 6 doses sont sans action.

b/ huile = 1,6648 g
résidu = 0,3776 = 22 %

1 dose min. théorique sera égale à 6,8 mg. 19 doses théoriques sont inactives.

Conclusion : Le purgatif a été détruit.

C. Saponifications enzymatiques

Les lipases permettent une destruction assez spécifique des glycérides. Elles pourraient aussi hydrolyser une fonction amide. Boymond (11) avait déjà mentionné que le purgatif semblait conservé, tout au moins en partie après attaque enzymatique de l'huile de croton. Nous avons étudié ce point de plus près et démontré que les lipases laissent intact le purgatif.

1°/ Saponification par la lipase du ricin pH = 4,7

Propriétés de la lipase du ricin (12)

- pH optimum = 4,7. On la fait donc agir en présence d'un tampon acide acétique/acétate d'ammonium, dont la molarité est de 0,5.

- température optimum = de 20 à 25°

- la moindre trace de solvant organique détruit rapidement cet enzyme.

Préparation de la lipase du ricin (13)

Dans un mortier, on écrase 20 g de Semen Ricini Ph.H.V., décortiquées immédiatement auparavant. On triture la pâte obtenue avec 10 x 15 ml d'eau distillée. On centrifuge pendant 15 min. à 2500-3000 tours/min. On a trois phases:

11) P. Boymond, Thèse, p. 35

12) E. Bamann und K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, vol. II p. 1580

13) R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz, H.S. 134: 161 (1924)

- 1/ la phase supérieure, "crémeuse", qui contient la majeure partie de l'enzyme. On la prélève par siphonnement.
- 2/ la phase moyenne, trouble.
- 3/ le culot = débris des graines.

On extrait le culot une seconde fois de la même manière et prélève la crème. 20 g de graines décortiquées en donnent de 15 à 26 g. On l'emploie telle quelle. Elle se conserve à 0° pendant 3 semaines.

Dosage de la lipase du ricin

essai

témoin

Dans un erlenmeyer de 100 ml

p = 2,5 g d'huile

p' = 2,5 g d'huile

e = 0,5 de lipase

e = 0

t = 2 ml de tampon acétate

t = 2 ml

Agiter vigoureusement pendant 3 min. et laisser 17 min. dans un thermostat à 25°.

Arrêter la réaction par addition de 30 ml d'alcool. Titrer avec KOH alcool.

0,5 n, au bleu de thymol.

a ml de KOH mesurent:

b ml mesurent:

acidité de l'huile brute

acidité de l'huile brute

+ acidité du tampon

+ acidité du tampon

+ acides gras libérés

$$\text{Calcul : } \left(\frac{a}{p} - \frac{b}{p'} \right) 280,5$$

$$I_e = 186$$

= % de saponification
(adapté de Bamann et Myrbäck
II/1575)

280,5 = facteur qui convertit le nombre de ml en mg de KOH

I_e = indice d'ester

1 unité = quantité d'enzyme qui, dans les conditions décrites, dégrade 2,5 g d'huile (d'arachide) de 7,5 %

En général, 0,2 g de lipase = 1 unité

Quelques préparations étaient moins actives: 1 unité = 0,35 g.

Hydrolyse enzymatique de l'huile de croton:

Elle a été réalisée dans les conditions décrites pour le dosage de la lipase; il est nécessaire d'agiter fréquemment le mélange pendant les premières heures d'incubation, jusqu'à ce que les acides gras libérés stabilisent l'émulsion.

La saponification est de 18 à 25 % en 20 min., de 28 % en 40 min., de 37 % en 1 heure, de 64,5 % en 2 h 30, de 80 % en 48 h comme en 7 jours. Il est donc inutile de poursuivre la dégradation au delà de 2 jours.

En traitant à nouveau par la lipase de ricin de l'huile déjà saponifiée, on peut encore éliminer 10 % de lipides. Mais étant donné la longueur et la complexité des manipulations, cela est peu intéressant au point de vue pratique.

2°) Saponification par la lipase de pancréas

Cette lipase travaille au pH de 8,5 - 9,0. Nous l'avons utilisée sous forme de pancréatine Ph.H.V. dont nous avons contrôlé l'activité lipolytique par la méthode de Willstätter et Waldschmidt-Leitz (14). Cette méthode ne convient pas pour une saponification poussée d'huile (Hydrolyse limite atteinte en 3 h) pour l'huile brute, 23 % pour l'huile préalablement neutralisée (15). Hoehne (16) mentionne d'ailleurs que les anions des acides gras supérieurs inhibent l'enzyme.

Nous avons eu recours à la méthode de Steudel (17)

Procédé : Dans un erlenmeyer on met :

5 g d'huile
1 g de pancréatine délayée dans un peu d'eau
0,2 g de thymol
5 g de lactate de Ca dissous dans 20 ml d'eau
quelques gouttes de phénolphthaléine alcoolique
50 ml d'eau distillée
0,25 g de fiel de boeuf (à ajouter en dernier lieu
pour éviter la formation de précipités)

14) E. Bamann und K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung II/1547

15) Ph.H.V. c. Suppl. I. éd.fr. p. 748 (1949) (méthode de neutralisation)

16) Hoehne, Z. ges. exp. Med. 101/43 (1937)

17) Steudel, Biochem. Z. 318/205 (1947)

On incube à 35°. Il n'est pas nécessaire d'agiter continuellement, car l'extrait de fiel de boeuf maintient l'état émulsionné. Le lactate de Ca précipite les acides gras au fur et à mesure de leur formation, laissant en solution de l'acide lactique, sans action sur la lipase. Au moyen de NaOH 0,1 n, on ajuste le pH à 8,5 2 ou 3 fois pendant le 1er jour d'incubation, quand la réaction est la plus rapide, puis toutes les 24 h. En 168 h = 7 jours, on atteint un degré d'hydrolyse de 60 à 70 %.

A la fin de l'incubation, qu'il s'agisse de la lipase de ricin ou de la pancréatine, nous sommes en présence du mélange suivant:

glycérol,
acides gras,
esters non saponifiés,
insaponifiable.

Ce mélange est vésicant. Il est purgatif à la même dose que l'huile brute, ce qui signifie que le principe actif a été intégralement conservé et par conséquent qu'il ne dépend pas d'une fonction glycéride ordinaire. Le mélange donne une réaction colorée de même intensité que l'huile brute.

Dans quelle fraction du mélange chercher le purgatif?

- 1) Le glycérol n'entre pas en ligne de compte
- 2) Les acides gras sont inactifs. Pour l'essai pharmacologique, on sépare les acides gras comme savons de zinc.

Procédé (18) : 5,17 g de mélange hydrolysé, correspondant à 2,46 g d'huile brute, sont dissous dans 50 ml d'alcool et additionnés d'une solution obtenue à chaud mais refroidie à 30° de 1,0 g d'acétate de Zn dans 50 ml d'alcool contenant 0,2 ml d'acide acétique glacial. On refroidit le mélange à 18° sous un courant d'eau froide, et laisse reposer une nuit à 18°. Le lendemain, on filtre sur Büchner, on lave le précipité à l'éther et le sèche sur silicagel. On obtient env. 0,8 g de savon Zn, inactifs à 0,16 g = 6 doses d'huile brute.

3) L'huile non saponifiée : Il semble assez peu probable que les glycérides non hydrolysés (y compris les di et monoglycérides apparaissant toujours lors de l'hydrolyse enzymatique) soient responsables du pouvoir purgatif: il serait curieux en

18) A. Bömer und B. Hagemann, Chem. Zblatt 1943 I/ 2054
(macrométhode)

effet que les lipases, enzymes peu spécifiques, eussent respecté sélectivement le ou les lipides purgatifs, pour ne saponifier que les lipides inactifs. Par conséquent, on devrait observer à tout le moins un affaiblissement de l'action purgative, ce qui n'est pas le cas.

4) Reste l'insaponifiable : On l'extrait en même temps que l'huile non saponifiée (3), par une méthode analogue à celle de la Ph.H.V. (19).

a) Huile saponifiée par la lipase de ricin

On saponifie 60 g d'huile avec 13 g d'enzyme, en présence de 48 ml de tampon. Au bout de 48 heures, on interrompt la réaction par addition de 150 ml d'éther. On neutralise au bleu de thymol avec de la potasse caustique alcoolique 0,5 n (a ml). (Transformation des acides gras en sels potassiques, solubles dans l'eau et pratiquement insolubles dans les solvants organiques). On ajoute au mélange 2a - 48 ml d'eau. Ainsi le mélange contient 2 fois plus d'eau que d'alcool, ce qui permet par la suite une bonne séparation des phases. On extrait la phase aquo-alcoolique 3 fois avec 350 ml d'éther, puis 1 ou 2 fois avec 100 ml. On lave les fractions étherées avec de l'eau distillée jusqu'à réaction neutre au tournesol. On les sèche une nuit sur sulfate de sodium anhydre et les distille.

Exemple : Huile brute = 58,2584 g, saponifiée à 78,8 %
Résidu d'extraction = 19,4515 g = 33,3 % de l'huile brute
Dose purgative minimum théorique = 0,01 g
Dose purgative minimum réelle = 0,01 g
pouvoir vésicant = +
Réaction colorée = 3 fois plus intense que celle de l'huile brute.

Par conséquent, l'huile extraite, comprenant l'huile insaponifiée et l'insaponifiable, contient tout le purgatif, inaltéré, tous les corps responsables de la réaction de Liebermann et le vésicant.

b) Huile saponifiée par la pancréatine

On saponifie 5,0 g d'huile brute avec 1 g de pancréatine. Au bout de 7 jours, on ajoute au mélange, qui contient env. 220 ml d'eau, de 100 ml d'alcool éthylique, et on extrait 2 fois avec 50 ml, puis 1 fois avec 30 ml d'éther. Les fractions

19) Ph.H.V. c. Suppl. I, éd. fr. p. 33 (1949)

éthérées sont lavées à l'eau distillée jusqu'à neutralité, séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées à pression réduite.

Exemple Huile brute = p = 5,0 g
NaOH 0,1 n utilisée = a = 178 ml
Huile témoin = p' = 5,0 g
NaOH 0,1 n utilisée par le témoin = b = 17 ml
Degré d'hydrolyse = X = 70 %

$$X = \frac{\left(\frac{a}{p} - \frac{b}{p'} \right) \cdot 400}{I_e = 186}$$

Résidu d'évaporation de l'éther = 1,7 g = 34 % de p
Dose purgative minimum théorique = 0,01 g
Dose purgative minimum observée = 0,009 g
Pouvoir vésicant = +
Réaction colorée = 3 fois celle de l'huile brute.

Donc, comme dans le cas de la lipase de ricin, l'huile extraite, c'est-à-dire l'huile non saponifiée + l'insaponifiable, contient tout le purgatif inaltéré, tous les corps responsables de la réaction de Liebermann, et le vésicant.

En résumé :

Le purgatif est détruit par l'éthylate de Na à 20° comme par la potasse alcoolique à 100°. Son action pharmacodynamique n'est donc probablement pas liée à une fonction hétéroside ou éther-oxyde. Elle pourrait dépendre d'une fonction ester.

Toutefois, nous avons montré par la suite la grande oxydabilité du purgatif. Il est possible aussi par conséquent, que nous ayons affaire ici, non pas à une saponification, mais à une oxydation, favorisée par le pH fortement alcalin et par l'élévation de la température, oxydation telle que peuvent en subir de nombreux phénols. Si tel est le cas, le purgatif pourrait aussi bien être un constituant de l'insaponifiable.

Ni la lipase du ricin (pH = 4,5), ni celle du pancréas (pH = 8,5 - 9) ne dégradent le purgatif. Si ce principe actif est tout de même un ester, il n'est en aucun cas un glycéride de type courant.

Les acides gras libérés par hydrolyse sont inactifs.

Le vésicant n'est pas dégradé par les lipases. Sa présence dans les huiles saponifiées de cette façon est un grand désavantage.

Chapitre deuxième

Essais de délipidation par passage sur une colonne d'alumine

Nous avons voulu voir si l'analyse frontale, applicable à des quantités d'huile relativement grandes, ce qui est nécessaire dans le cas d'un principe actif représentant un très faible pourcentage de la drogue, permettait de séparer une fraction enrichie en purgatif. Nos essais ont porté d'une part sur l'huile brute, d'autre part sur l'huile restant après saponification partielle par la lipase du ricin, dissoutes dans du pentane sec à la concentration de 10 %.

Essais sur l'huile brute : 100 g d'huile sont dissous dans 1 litre de pentane ou d'hexane, et écoulés sur 150 g d'alumine (Brockmann I). On suit la marche de la chromatographie au moyen de la réaction colorée, à laquelle on procède tous les 30 ml environ. Si elle ne se modifie pas sur plusieurs fractions successives (couleur, intensité), on limite les fractions à 300 ml. On vérifie d'autre part l'effet purgatif et vésicant des fractions. Le pouvoir purgatif se trouve localisé dans le dernier tiers du volume total de l'éluat. Son résidu d'évaporation pèse environ 25 g. Il est purgatif à la dose de 8 mg. Autrement dit, cette fraction est 4 fois moins abondante en poids et 3 - 4 fois plus purgative que l'huile brute. Son enrichissement est comparable à celui que permet de réaliser la saponification enzymatique. Son principal avantage est de ne plus contenir de vésicant, retenu par la colonne, et qui peut être élué par l'éther ou un mélange en parties égales de chloroforme et de méthanol.

Nous avons noté dans les lères fractions une réaction colorée verte, due peut-être au stérol cristallisé par

Boymond (20).

La répétition de la chromatographie sur la fraction enrichie est sans intérêt, puisqu'on n'arrive pas à une concentration plus poussée, mais au contraire à une dispersion: le purgatif est réparti entre les fractions éluées au pentane et celles éluées au benzène.

Des essais sur l'huile concentrée obtenue par saponification à la lipase de ricin n'ont pas conduit à un enrichissement du purgatif dans une fraction déterminée.

Dans tous les essais, quel que soit le matériel de départ, nous avons remarqué les faits suivants, qui soulignent la complexité des huiles étudiées:

1^o) la multiplicité de la réaction colorée. Toute une série de corps doit en être responsable. Il n'y a toutefois pas de parallélisme entre l'intensité des réactions colorées et le pouvoir vésicant.

2^o) Le nombre élevé des bandes colorées visibles sur la colonne, à la lumière du jour comme en lumière ultra-violette.

3^o) Les huiles éluées sont jaune pâle, alors que les huiles de départ sont jaune rouge ou rouge brun.

4^o) Le purgatif est élué avec les dernières fractions pentaniques (ou hexaniques) ou dans le benzène. Il doit donc être plus polaire que les glycérides, mais moins que le vésicant qui, dans les mêmes conditions, reste adsorbé.

En résumé, le procédé de filtration sur alumine n'est applicable avec profit qu'à l'huile brute. Il permet de séparer une huile aussi enrichie que le procédé de saponification par les lipases. Le procédé à l'alumine a l'avantage d'éliminer le vésicant.

20) Loc. cit. p. 33

Chapitre troisième

Essais de délipidation par concentration au méthanol 100 %

Il s'agit ici de la reprise et de la simplification du procédé de Boymond (21). Dans ce cas un peu particulier, il s'agit de partager le principe purgatif entre 2 phases non miscibles, l'une étant constituée par du méthanol, l'autre par les glycérides de l'huile de croton. Bien entendu, le méthanol n'extraît pas seulement le purgatif, mais aussi le vésicant, des acides gras libres et les glycérides hydroxylés entre autres. Toutefois, on peut débarrasser facilement la solution méthanolique du vésicant: il suffit de lui ajouter 10 % d'eau, et l'on observe le dépôt d'une huile à peu près non vésicante et très purgative. Si l'on ajoute une nouvelle fois 10 % d'eau à l'extrait méthanolique il y a séparation d'une huile très visqueuse, exceptionnellement vésicante.

Méthode : On agite au vibromischer 1 volume d'huile de croton avec 1 volume de méthanol pendant 5 à 10 minutes. Ensuite, on centrifuge 15 minutes à 2500 tours/minute, à la température ordinaire. On siphonne la phase alcoolique surnageante. On reprend le culot plusieurs fois avec son volume de méthanol. On abandonne l'huile résiduelle. Aux extraits méthanoliques, on ajoute 10 % d'eau, on agite, on centrifuge et on siphonne. On étudie l'huile, qui constitue la phase lourde.

Nous avons préparé selon cette méthode, 3 types d'huile, à savoir:

(21) Loc. cit. p. 10

- H 14 (16 extractions méthanoliques)
- H 65 (8 " ")
- H 43 (4 " ")

Leurs propriétés sont exposées dans le tableau No I.

Tableau No I

Concentration au CH_3OH 100 %

Huile	Nombre d'extr.	Huile insolubilisée par addition de 10 % d'eau au méthanol										
		% prise initiale	v	p d,min.mg	E	Rdt %	R.C.	I ₂	ac.	sap.	e	ins. %
Brute	0	100	+	25 -- 30			1	97	13	199	186	0,9
H 14	16	14	-	14	2 x	30	2,35	66	8,5	188	180	2,0
H 65	8	13	+	12	2,5x	30	3			185		2,5
H 43a	4	8,5	±	4	7 x	59	3	60	18,7	163	144	2,5
H 43b	4	8,3	+	4	7 x	54	3					2,6
H 43c	4	13	±	6	5 x	62						
HR**		85-90	+	5 d. in-actives				104	1,4	190	187	

HR** = huile restant après 4 extractions au méthanol

v = vésicant

p = purgatif

E = enrichissement

Rdt = rendement

R.C. = réaction de Liebermann
(réaction colorée)

I₂ = indice d'iode

ac = indice d'acidité

sap= indice de saponification

e = indice d'ester

ins = insaponifiable

Remarques :

- 1) H 43, obtenue à partir des 4 premiers extraits méthanoliques est l'huile la plus active (7 fois autant que l'huile brute). C'est aussi dans ce cas qu'on a le meilleur rendement en purgatif (env. 60 %). Viennent ensuite, dans l'ordre décroissant d'activité, H 65 (8 extractions), puis H 14 (16 extractions).
- 2) Les indices de H 43 montrent qu'elle comporte moins d'esters, plus d'acides libres et qui sont plus saturés, et un insaponifiable plus abondant. Ceci confirme que le purgatif n'est pas un glycéride.
- 3) Le purgatif passe dans les premiers extraits méthanoliques. Cela met en évidence sa polarité plus grande que celle des glycérides.
- 4) Les corps qui donnent la réaction colorée sont plus abondants dans les huiles concentrées. Leur enrichissement évolue parallèlement à l'enrichissement en insaponifiable. Dans le cas de H 65, il semble aussi aller de pair avec l'enrichissement en purgatif. Mais ce n'est plus le cas pour H 43: l'enrichissement en purgatif est alors beaucoup plus important (7/3). Donc, le purgatif est tout au plus un des corps qui réagissent avec le réactif de Liebermann.
- 5) L'huile résiduelle, au contraire des huiles concentrées, contient une forte proportion de corps non saturés, et très peu d'acides libres.

Si maintenant nous comparons les 3 procédés exposés dans les chapitres I, II et III, il est évident que le moins intéressant est le premier, malgré un bon rendement, à cause de la présence du vésicant. Le second est celui qui conduit le plus sûrement à un produit privé de propriétés vésicantes. Le 3ème a sur les autres le grand avantage de permettre un enrichissement important. C'est celui que nous avons employé de préférence.

Chapitre quatrième

Deuxième stade d'enrichissement

Partage entre 2 solvants non miscibles

Nous avons essayé de faire subir au produit enrichi par concentration au méthanol 100 % un nouveau partage, mais cette fois en solution diluée (1 % au maximum). Nous avons choisi le système méthanol à 10 % d'eau/hexane. Etant donné les observations faites précédemment sur la polarité du purgatif, on peut espérer que, dans ces conditions, le méthanol aqueux extraira non seulement les dernières traces du vésicant, mais aussi le purgatif, tandis que l'hexane servira de solvant aux lipides.

Matériel étudié : H 43, récemment préparée, active à 6 mg.

1°) Phase fixe = méthanol, phase mobile = hexane

Méthode : On dissout une prise p d'huile dans du méthanol 100 % puis on ajoute 10 % d'eau, de façon que la solution finale contienne ≤ 1 % d'huile. Le méthanol à 90 % est agité plusieurs fois avec de l'hexane, chaque fois pendant 5 minutes. On centrifuge pendant 10 minutes, on prélève la phase alcoolique et la concentre à pression réduite jusqu'à ce qu'il ne reste dans le ballon que de l'eau plus ou moins émulsionnée avec des gouttelettes d'huile. Cette huile, qui doit contenir le purgatif est extraite au chloroforme ou au chlorure de méthylène (détails voir tableau 2). On évapore chaque fraction, on pèse les résidus qui sont jaune pâle et on les teste après dilution convenable dans l'huile d'arachides. La phase aqueuse est utilisée telle quelle; elle a toujours été inactive.

Durant l'évaporation des solvants, il faut prendre 2 précautions: il faut maintenir la température du bain-marie à

≤ 35° et garder les solutions à l'abri de l'air, par ex. atmosphère de CO₂.

Résultats: Voir tableau no 2.

- 1) Le 90 % de l'huile H 43 mise en jeu passe dans l'hexane, le 10 % seulement dans le méthanol.
- 2) Ces 10 % sont responsables de toute l'activité purgative.

Si l'on fait l'essai pharmacologique immédiatement, on trouve une dose minimum purgative d'env. 0,5 mg pour l'huile résiduelle. Cette huile est donc enrichie 10 à 15 fois par rapport à l'huile concentrée au méthanol, et env. 70 fois par rapport à l'huile brute. Au bout de 12 heures de stockage à la température ordinaire, l'activité est déjà trois fois moindre. Au bout de 2 jours à 20° ou de 8 jours à 4°, elle peut être considérée comme nulle. Nous avons pensé que cette rapide détérioration consiste en une autoxydation. Dans l'huile entière, le principe purgatif serait conservé grâce aux glycérides non saturés fonctionnant comme antioxygènes. En tout cas, il s'agit bien d'une oxydation, puisqu'un produit actif agité avec une solution de permanganate en provoque la réduction et ne présente ensuite plus d'activité purgative. D'autre part, il est possible de prolonger de quelques jours l'activité du produit en le stockant à 4° en présence d'acide ascorbique ou de hydrogénosulfite de sodium.

La fragilité du purgatif est encore démontrée par le fait que si la température du bain-marie s'élève à 60 ou 70° pendant l'évaporation du solvant chloré, on obtient une huile brune et dépourvue d'action pharmacologique.

2°) Phase fixe = hexane, phase mobile = méthanol

Ce procédé, appliqué à une solution à 5 % dans l'hexane de H 43, nous a donné un résultat paradoxal en ce sens que l'activité purgative n'a pas passé entièrement dans la phase méthanol à 90 %. Ce fait est peut-être dû à la lenteur avec laquelle s'établit l'équilibre entre les 2 phases. Les quelques essais que nous avons faits ont montré toutefois 2 faits:

- 1) Le pouvoir extracteur du méthanol est d'autant plus faible qu'il contient plus d'eau. Ceci est vrai en particulier pour les corps donnant la réaction de Liebermann. Par contre, le méthanol le plus riche en eau (60 %) a extrait un reste de vésicant, imperceptible dans la solution hexanique ou dans le méthanol à 90%. Ceci confirme la polarité plus grande du vésicant.

2) La réaction au permanganate est donnée aussi par des fractions non purgatives; lorsqu'elle est positive, elle n'établit donc pas la présence du ou des principes purgatifs. Par contre lorsqu'elle est négative, elle en prouve l'absence.

Tableau no 2

Enrichissement par partage d'une huile concentrée au CH_3OH et active à 6 mg

Huile g	CH_3OH ml	Hexane ml	CHCl_3 ou CH_2Cl_2 ml	Huile g	résiduelle* % de la prise	essai pharmacologique	D.min.p mg	E.	Rdt %
1,0355	300	50,60,60	40,25,25	0,099	9,5	immédiat	0,57	10 x	100
5,0234	500	3 x 100 puis 4 x 60	75,50,50	0,3365	6,7	immédiat	0,4	15 x	100
						2 j. 20°	3 d. in. actives		
						8 j. 4°	3 d. in.		
5,0016	500	3 x 400	75,50,50	0,3384	6,7	12 h 20°	1,2		

d.min. p. = dose minimum purgative

E = enrichissement

Rdt = rendement

Huile résiduelle = obtenue par évaporation du solvant chloré

Deuxième partie

Etudes préliminaires sur l'huile enrichie 70 fois

(Huile concentrée purgative = H.C.P.)

1) Analyses élémentaires qualitatives

L'analyse élémentaire qualitative de l'huile enrichie 70 fois n'a rien donné de remarquable. La recherche des halogènes, du soufre, du phosphore a été négative. Il n'y aurait donc que du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène dans le produit.

A) Essais de chromatographie

Les H.C.P. sont nécessairement de composition plus simple que l'huile brute. On doit pouvoir les étudier par chromatographie. La première condition à satisfaire est d'avoir un révélateur aussi spécifique que possible.

A. Recherche d'un révélateur

Pour rechercher un révélateur, nous avons utilisé une solution hexanique à 1 % d'une H.C.P. active à 0,4 mg. Les prises de 0,05 ml de cette solution correspondant à 0,05 mg de produit ont été déposées sur du papier Whatman no 1 et séchées dans un courant de gaz carbonique. Les taches obtenues ont été soumises immédiatement à l'action de toute une série de réactifs permettant de déceler les principales fonctions de la chimie organique, et contrôlés au moyen de substances connues. Sont exclus dans ces conditions, tous les révélateurs à base d'acide sulfurique concentré, et en particulier le réactif de Liebermann.

Nous n'avons pu mettre en évidence aucune des fonctions suivantes:

phénols (acide phosphomolybdique (22) - acide sulfanilique diazoté) (23)

thiols nitroprussiate de Na (24)

sucres réducteurs nitrate d'argent (25) phthalate d'aniline (26)

aldéhydes réactif de Schiff (27) - nitrate d'argent (25)

acides hydroxylés iode + iodure de K (28)

ou cétoniques

cétostéroïdes nitrate d'argent ammoniacal (29) - iode + iodure (28)

bases puriques nitrate d'argent ammoniacal (29)

aminesprimaires diazotation + copulation (30)

aromatiques

acides aminés ninhydrine (31)

carotènes trichlorure d'antimoine (32)

esters phosphoriques acide molybdique + acide chlorique (33)

Ajoutons que la réaction de Bornträger (34), caractéristique des hétérosides anthraquinoniques, effectuée en éprouvette, a aussi été négative.

L'huile concentrée purgative se distingue par les caractères positifs suivants:

1) Avec le bleu de thymol alcalin (35), on observe des taches jaunes sur fond bleu, qui indiquent un pH acide, dû sans doute à la présence d'acides gras dans notre produit.

22) Solution aqueuse à 10 %

23) F. Cramer, Papierchromatographie Verlag chemie, Weinheim 1952

24) A. Wettstein, Helv.Chim.Acta 35: 283 (1952) p.60

25) NO_3Ag 0,1 n

26) F. Cramer, loc. cit. p. 55

27) 0,2 g p-rosaniline + 2 ml ClH conc. dans 200 ml d'eau. Ajouter 2 g SO_3HNa

28) G. Marini-Bettolo-Marconi e S. Guarino, Exp. 6: 309 (1949)

29) L. Hough, Nature 165: 400 (1950)

30) F. Cramer, loc. cit. p.83. Nous avons remplacé la N-éthyl-naph-tylamine par le B-Naphtol.

31) S. Moore and W.H. Stein, J. Biol. Chem. 176: 367 (1948)

32) Solution chloroformique à 1%

33) F. Cramer, loc. cit. p. 46

34) Ph. H. V c. Suppl. I, article Cortex Rhamni Frangulae, éd.fr. p. 317 (1949)

35) F. Cramer, loc. cit. p. 63

2) L'huile concentrée purgative est fluorescente en lumière ultraviolette. Elle présente un maximum d'absorption vers 2400 Å ce qui n'est guère spécifique. L'inactivation de l'huile ne provoque pas la disparition de cette propriété, qui n'a donc aucun intérêt pour la recherche du principe purgatif.

3) L'huile concentrée purgative réduit le permanganate en milieu acide comme en milieu alcalin, alors qu'elle ne réagit ni avec le nitrate d'argent, en solution neutre ou ammoniacale, ni avec l'iode, ni avec le fer (III) sous forme de chlorure ou de ferricyanure.

La réaction avec le permanganate est le fait de tous les produits actifs, à condition qu'il s'agisse d'un produit enrichi au moins 50 fois: l'huile brute ou l'huile enrichie 7 fois par concentration au méthanol ne la donnent pas plus que l'huile d'olives ou d'arachides.

Les produits désactivés ne la donnent plus, et l'on a pu inactiver une huile H.C.P. en l'agitant avec une solution de permanganate.

Malheureusement, elle n'est pas spécifique. D'autres substances présentes dans les huiles concentrées peuvent la présenter (voir page 21). Ainsi donc, une réaction positive ne permet pas d'affirmer la présence du purgatif dans une huile H.C.P. Par contre, une réaction négative met en évidence l'absence ou la détérioration du principe actif.

B. Essais de chromatographie sur papier

Nous avons effectué quelques essais de chromatographie sur papier Whatman no 1 horizontal, dans un appareil étanche, en atmosphère de CO_2 . Après développement, les chromatogrammes ont été séchés à pression réduite, dans l'appareil même, pour être soumis immédiatement à la révélation au permanganate.

Nous avons utilisé les solvants suivants, contenant 0 à 60 % d'eau: alcool butylique secondaire, propanol normal, benzène, propanol normal + benzène.

Avec les solvants contenant 0 à 50 % d'eau, toute la tache migre avec le front, et ceci même en présence d'ammoniaque ou d'acide acétique. Avec le mélange de 40 % de propanol normal + 60 % d'eau, on observe une tache à la hauteur du front et une deuxième au point de départ.

Ces résultats peu encourageants nous ont fait

abandonner cette technique.

C. Essais de chromatographie sur colonne (36)

Huile étudiée : H.C.P., active à env. 0,5 mg, introduite en solution dans du chlorure de méthylène sur alumine imprégnée du même solvant.

Alumine : Woelm-Eschwig I neutre, désoxygénée par traitements successifs à la trompe à vide et au gaz carbonique pur. La colonne a été enveloppée de papier noir, dans lequel une fenêtre mobile avait été ménagée. L'éluat a été recueilli dans des ballons ronds de 50 ml, où passait un lent courant de gaz carbonique. Il a été évaporé à pression réduite, dans un bain-marie de 30 à 35°.

Eluants : Dans l'ordre : Chlorure de méthylène 100 %, puis le même solvant contenant successivement 1, 2, 5, 10, 20 et 50 % d'alcool absolu, puis alcool absolu, puis alcool absolu contenant 1% d'eau. On change le solvant dès que le résidu d'une fraction est inférieur à 1 mg.

Fractions : 20 ml. Elles ont été examinées au point de vue de la réaction colorée et de leur pouvoir réducteur vis-à-vis du permanganate. Après évaporation du solvant, le résidu a été pesé. La mesure de l'indice de réfraction a été rapidement abandonnée, car ses variations étaient trop petites pour pouvoir rendre de réels services. Durant l'un des essais, nous avons examiné fréquemment la colonne en lumière ultraviolette.

Les résultats consignés dans le tableau no 3 sont reproductibles. Après élution, la colonne présente à l'ultraviolet au moins 4 bandes fluorescentes distinctes. Parmi les fractions éluées, seules les 2 premières réduisent le permanganate; elles seules pourraient donc contenir le purgatif. Mais elles se sont montrées inactives. Les résultats des quelques essais que nous avons eu le temps de faire sont donc négatifs en ce qui concerne l'isolement du purgatif. Ils montrent toutefois la très grande complexité du mélange représenté par une huile concentrée déjà 70 fois en effet purgatif.

Que le pouvoir purgatif n'ait pas été retrouvé peut résulter de diverses causes. Ou bien le purgatif a été détérioré malgré les précautions prises (action de traces d'air, action de l'alumine); ou bien il est resté adsorbé. Il faut reprendre le problème en faisant varier l'adsorbant.

36) T. Reichstein, Disc. Faraday Soc. 7: 306 (1949)

Tableau no 3

Essais de chromatographie sur colonne

Solution : 200 mg de H.C.P. active à 0,5 mg sont dissous dans
200 ml de chlorure de méthylène

Alumine : 6 g

Colonne : Hauteur = 180 mm, diamètre = 15 mm

Solvant	Fraction n°	Poids mg	Réaction colorée	MnO ₄ K
CH ₂ Cl ₂	0'	12	+ j. or.	-
	1	39,6	+ r.	+
	2	1,4	+ r.j.pâle	-
	3	2,2	-	-
	4	0,0	-	-
	5	0,0	-	-
	6	0,6	-	-
CH ₂ Cl ₂ + 1 % EtOH	7	0,0	-	-
	8	22,7	+ j.or.	+
	9	24,4	+ j.	+
	10	4,6	+ j.pâle	+
	11	0,5	-	-
CH ₂ Cl ₂ + 2 % EtOH	12	0,0	-	-
	13	1,4	+ j.pâle	-
	14	0,1	-	-
	15	1,5	-	-
	16	1,6	-	-
	17	1,7	-	-
	18	0,0	-	-
	19	0,0	-	-
	20	1,0	-	-
CH ₂ Cl ₂ + 5 % EtOH	21	0	-	-
	22	2,2	-	-
	23	0,0	-	-
	24	0,0	-	-

Tableau No 3 (suite)

Solvant	Fraction	Poids	Réaction colorée	MnO ₄ K
CH ₂ Cl ₂ + 10 % EtOH	25	0,0	-	-
	26	1,0	-	-
	27	1,0	-	-
	28	1,0	-	-
	29	0,0	-	-
CH ₂ Cl ₂ + 20 % EtOH	30	0,0		
	31	2,9		
	32	0,0		
	33	0,0		
CH ₂ Cl ₂ + 50 % EtOH	34	0,0		
	35	0,0		
EtOH 100 %	36-7-8	0,0		
EtOH + 1 % H ₂ O	39-41	0,0		
EtOH 96 %	42-43	0,0		
	44	2,1		
Poids total de substance éluee (sauf la dernière fraction)				
122,5 mg = 61,2 %				

RESUME

- 1) Nous avons étudié le comportement du pouvoir purgatif de l'huile de croton vis-à-vis de différents agents de saponification. La potasse alcoolique à chaud ou l'éthylate de sodium en milieu anhydre et à froid le détruisent rapidement. Par contre, nous avons constaté que les lipases, mêmes alcalines, ne l'attaquent pas, mais qu'on le retrouve dans la fraction d'huile insaponifiée, enrichi 3 fois.
- 2) Par passage sur une colonne d'alumine, on peut arriver à un enrichissement comparable dans le filtrat.
- 3) Par un procédé de concentration au méthanol, on peut obtenir des huiles enrichies de 2 à 7 fois.
- 4) L'huile enrichie 7 fois par traitement au méthanol se partage aisément entre l'hexane (qui extrait la majeure partie des glycérides) et le méthanol contenant 10 % d'eau (qui retient le purgatif). On arrive ainsi à des huiles concentrées purgatives enrichies 60 à 80 fois, par rapport à l'huile brute.
- 5) Ces huiles concentrées purgatives sont fluorescentes en lumière ultraviolette; elles ne contiennent ni azote, ni soufre, ni halogènes. Elles réduisent le permanganate de potassium en milieu alcalin comme en milieu acide. Ce pouvoir réducteur n'est pas spécifique du purgatif, quoiqu'il soit une de ses caractéristiques.
- 6) Comme l'ont montré quelques essais préliminaires de chromatographie sur alumine, ces huiles concentrées purgatives sont encore très complexes. L'alumine ne se prête pas à un isolement du ou des principes purgatifs, car ils sont détruits ou retenus.

En conclusion, l'étude du ou des principes purgatifs est loin d'être terminée et le présent travail n'est qu'une modeste contribution à l'éclaircissement de ce problème.

Table des matières

	pages
Introduction	5
Première partie : Préparation d'une huile concentrée purgative	7
I. Essais de délipidation par saponification	8
II. Essais de délipidation par filtration sur alumine	15
III. Essais de délipidation par concentration au méthanol	17
IV. Deuxième stade d'enrichissement : Partage entre 2 solvants non miscibles	20
Deuxième partie : Essais préliminaires sur l'huile enrichie 70 fois	23
I. Analyse élémentaire qualitative	23
II. Essais de chromatographie	23
A : Recherche d'un révélateur	23
B : Chromatographie sur papier	25
C : Chromatographie sur colonne	26
Résumé	29

